

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 3 月 2 7 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 0 8 7 0 3 2
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 0 8 7 0 3 2]

出 願 人 株 式 会 社 タ ク マ
Applicant(s):

2 0 0 3 年 7 月 2 4 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 5 8 9 3 2

【書類名】 特許願

【整理番号】 P103T07048

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【提出日】 平成15年 3月27日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市荒井町新浜 1 丁目 2 番 1 号 株式会社タク
マ 環境・エネルギー研究所内

【氏名】 藤平 弘樹

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市荒井町新浜 1 丁目 2 番 1 号 株式会社タク
マ 環境・エネルギー研究所内

【氏名】 中谷 康平

【特許出願人】

【識別番号】 000133032

【氏名又は名称】 株式会社タクマ

【代理人】

【識別番号】 100104673

【弁理士】

【氏名又は名称】 南條 博道

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 050740

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

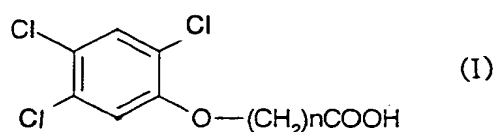
【書類名】 明細書

【発明の名称】 2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルカルボン酸およびそれを用いたダイオキシン類の測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の式 (I) :

【化 1】

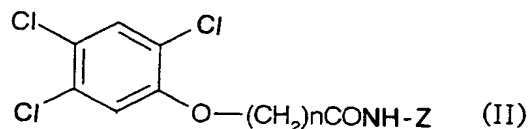


(ここで、n は 1 から 10 の整数を示す) で表される 2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルカルボン酸。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の 2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルカルボン酸を競合免疫測定用の抗原として用いることを特徴とする、ダイオキシン類の免疫測定法。

【請求項 3】 以下の式 (II) :

【化 2】



(ここで、n は 1 から 10 の整数を示し、Z は担体化合物または標識物質を表す) で表される 2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルアミド誘導体。

【請求項 4】 請求項 3 に記載の 2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルアミド誘導体を競合免疫測定用の抗原として用いる、ダイオキシン類の免疫測

定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルアミド誘導体およびこれを用いるダイオキシン類の免疫測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ダイオキシン類とは、ポリ塩素化ジベンゾ-p-ダイオキシン類(polychlorinated dibenzo-p-dioxins; PCDDs)、ポリ塩素化ジベンゾフラン類(polychlorinated dibenzofurans; PCDFs)、およびコプラナーPCB(coplanar polychlorinated biphenyl: Co-PCBs)の総称である。PCDDsおよびPCDFsには、塩素の数と存在位置により、それぞれ75種および135種もの非常に多くの異性体が存在し、異性体により毒性の強さが大きく異なる。特にPCDDsおよびPCDFsでは、2, 3, 7および8位に塩素が存在する異性体は強い毒性を有している。その毒性症状には、胸腺萎縮、肝臓肥大、消耗飢餓症状、塩素座そうなどがある。また、低濃度のダイオキシンであっても長期間の曝露により、晩発性皮膚ポルフィリン症などの慢性的な症状が現れ、催奇形性、発ガン性、助ガン性といった多種多様な毒性を示すことも知られている。

【0003】

更に近年、ある種の化合物が生物の内分泌機能を攪乱する作用を有することがわかり、いわゆる「内分泌攪乱物質」として、世界的な環境問題としてクローズアップされている。ダイオキシン類もエストロゲン活性を有する内分泌攪乱物質の一つである疑いがあることも判明している。

【0004】

このように様々な毒性を持つダイオキシン類が、除草剤や殺虫剤などの化学製品、ゴミ焼却場から出る排ガスやフライアッシュ、製紙工場からの排水中などに含まれていることが明らかとなってきた。このため、大都市周辺の河川や港湾の水や底質、大気、土壌などの環境に由来する試料のみならず、食品、血液、母乳

、尿といった生体由来の試料からもダイオキシン類が検出されており、汚染が広範囲に広がっていることが問題視されている。このように環境中のダイオキシン類が大きな社会問題となっているため、環境中のダイオキシン類の存在量を把握することが急務である。

【0005】

ダイオキシン類の測定は、精度の高い分析値が要求されるため、通常、公定分析法に従って測定が行われている。この分析法においては、抽出、濃縮、精製などに用いられる各種のクロマトグラフィー、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計などの高価な分析装置を含む機器が用いられる。公定分析法は高感度で、複数の化合物を一度に同定、定量できる多成分分析が可能であるが、高価で特殊な機器、クリーンルームなどの設備が必要であり、分析にも熟練した技術が必要とされる。さらに、前処理の煩雑さのために結果を得るまでに時間がかかるといった問題を抱えている。このため、精度が高くかつ簡便な測定方法の開発が望まれており、このような問題を解決すべく、比較的安価で簡便な抗原抗体反応を利用した免疫測定法によるダイオキシン類の測定方法が求められている。

【0006】

免疫測定法とは、抗体が抗原を特異的に認識する能力を用いて微量の抗原を検出する方法であり、抗体の抗原に対する高い親和性と高い特異性により抗原を高感度に測定することができる。試料の前処理も簡便であるため、多検体の測定を簡易かつ迅速に行なうことができ、測定に要するコストが低いという種々のメリットを有する。そのため、医学、生化学、薬学、農学など広い分野で利用されている。

【0007】

免疫測定法において測定対象物質を検出するには、抗体または抗原を認識する必要があり、種々の標識が利用されている。免疫測定法としては、標識の種類により、酵素免疫測定法（EIA）、放射性免疫測定法（RIA）、蛍光免疫測定（FIA）などが挙げられる。これらの免疫測定法のいずれにおいても、測定対象の化合物と同じ化合物を用いて検体と同様に測定して標準曲線を得、この標準曲線を用いて検体中の化合物濃度を算出する。

【0008】

一般に、臨床検査や生化学分野での測定においては、これらの方法のうち測定の簡便さから E I A が利用されており、ダイオキシン類の測定にも E I A の利用が試みられている。しかしながら、ダイオキシン類としては、上述のように特定の基本骨格を有する 3 種のタイプが存在し、さらに塩素置換数の異なる多くの異性体が存在する。そのため、どの化合物を指標にするかが問題となる。例えば、これまでに開発されたダイオキシン類の E I A 測定系の多くは、最も毒性が高い 2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン (2, 3, 7, 8-TeCDD) を測定対象物としており、これを標準品として測定を行っている (非特許文献 1)。

【0009】

しかし、この方法では、毒性の強いダイオキシンをハプテンとした標識抗原または固相化抗原を用いるため、これらの取扱い並びに廃棄の問題から、使用を制限される可能性がある。

【0010】

そこで、毒性化合物以外の化合物を用いてこれを抗原とすることができれば、取扱いが簡便となり、ダイオキシンの安全かつ迅速な測定法が提供される。特許文献 1 および 2 には、PCB の代替化合物が提案されているが、ダイオキシンに特異的な化合物は未だ提供されていない。

【0011】

【特許文献 1】

特開 2002-128731 号公報

【特許文献 2】

特開 2002-131316 号公報

【非特許文献 1】

Anal. Chem. 70, pp. 1092-1099

【非特許文献 2】

Kun Chae, et al., J. Agric. Food., 25, 1207~1209 (1977); Simona G. Merica, et al., Can. J. Chem., 73, 826~834 (1995)

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、上記課題を解決することにより、環境試料中のダイオキシン類を簡便に測定できる免疫測定用抗原となり得る化合物を提供すること、およびこの化合物を抗原として用いるダイオキシン類の免疫測定法を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記事情に鑑み、鋭意検討した結果、2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルカルボン酸がダイオキシン類のEIA測定系における競合免疫測定用の抗原として有用であることを見出し、本発明を完成させるに至った。

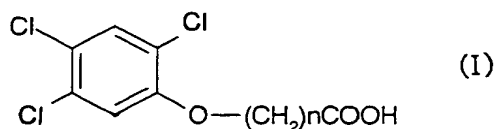
【0014】

(本発明の化合物)

本発明は、以下の式(I)：

【0015】

【化3】



【0016】

(ここで、nは1から10の整数を示す)で表される2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルカルボン酸を提供する。

【0017】

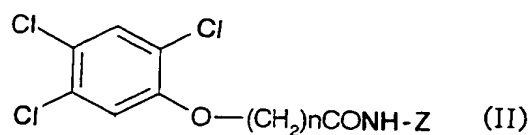
また、本発明は、2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルカルボン酸を競合免疫測定用の抗原として用いることを特徴とする、ダイオキシン類の免疫測定法を提供する。

【0018】

また、本発明は、以下の式 (II) :

【0019】

【化4】



【0020】

(ここで、nは1から10の整数を示し、Zは担体化合物または標識物質を表す) で表される2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルアミド誘導体を提供する。

【0021】

さらに本発明は、前記2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルアミド誘導体を競合免疫測定用の抗原として用いるダイオキシンの免疫測定法を提供する。

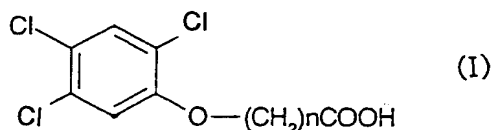
【0022】

【発明の実施の形態】

本発明の2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルカルボン酸は以下の式 (I) で表される:

【0023】

【化5】



【0024】

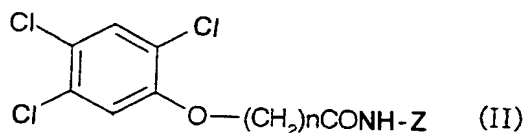
nは1から10の整数である。以下、この物質を化合物（I）と記載する場合がある。nは3～8が好ましく、5～7であることがさらに好ましい。この化合物（I）は、後述のようにスクシンイミジル化され、キャリアー蛋白質（例えば牛血清アルブミン（BSA）など）と結合され、競合免疫測定用の抗原として用いられる。

【0025】

本発明の2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルアミド誘導体は、以下の式（II）で表される：

【0026】

【化6】



【0027】

nは1から10の整数を示し、Zは担体化合物または標識物質を表す。以下、この物質を化合物（II）と記載する場合がある。nは3～8が好ましく、5～7であることがさらに好ましい。この化合物（II）は、化合物（I）から誘導され得る。Zの担体化合物としては、例えば、アミノ酸あるいはタンパク質が挙げら

れる。このアミノ酸あるいはタンパク質の残基を介して、化合物 (II) が固相に固定される。標識物質としては、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P)、アルカリフォスファターゼ (A L P) などが挙げられる。

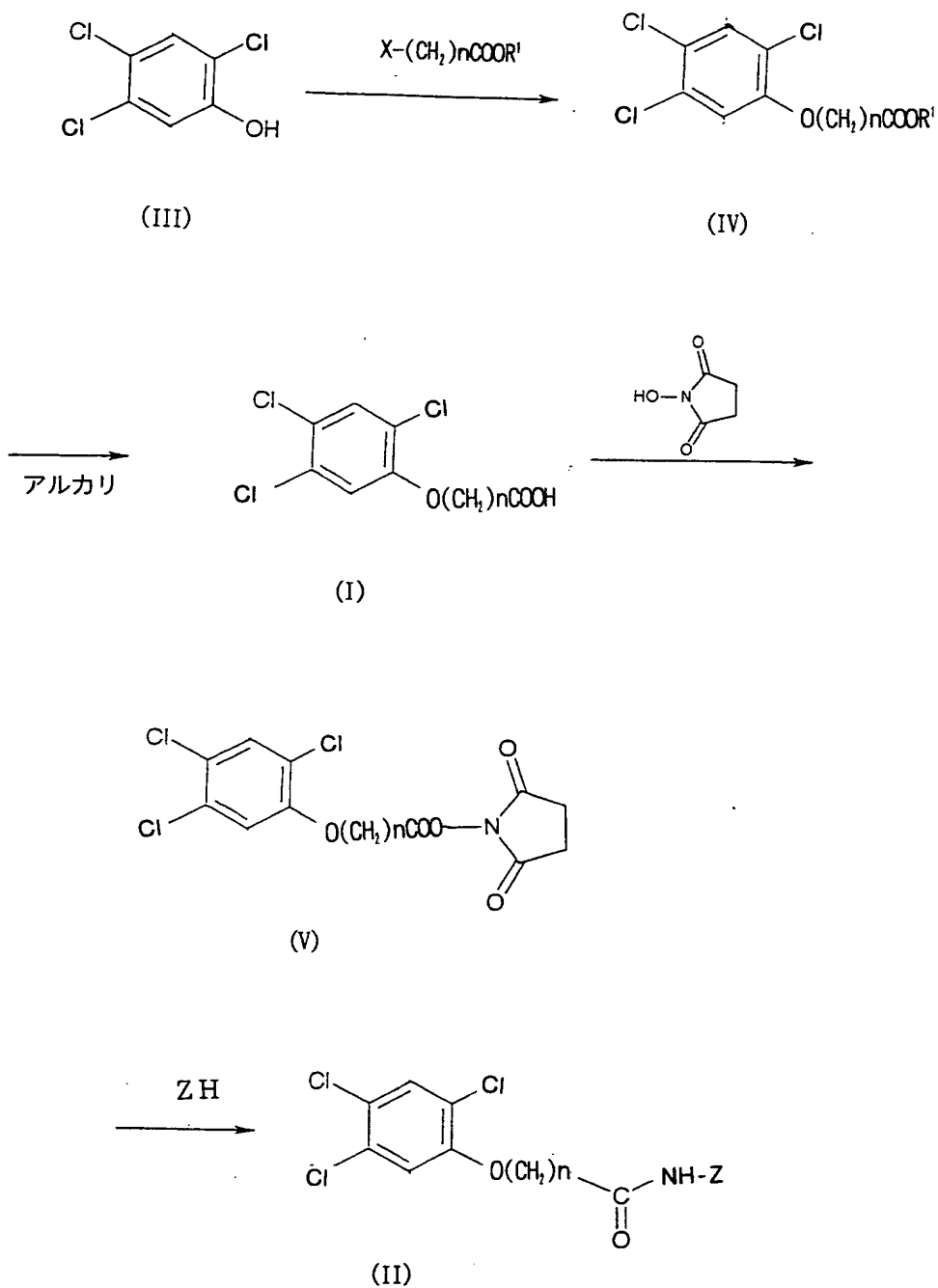
【0028】

(本発明の化合物 (I) および (II) の合成)

化合物 (I) および (II) は、例えば、次の方法により合成される。

【0029】

【化 7】



【0030】

まず、2, 4, 5-トリクロロフェノール (III) にハロゲン化脂肪酸アルキ

ルエステルを反応させて、2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルカルボン酸アルキルエステル (IV) を形成させる。次いで、アルカリでケン化することによって化合物 (I) が得られる。得られた化合物 (I) とN-ヒドロキシスクシンイミドとを反応させて、式 (V) で示される活性化エステルを合成し、次いでこれをアミノ酸 (グリシンなど)、ペプチドなどのアミノ基を含有する化合物と反応させることによって、化合物 (II) が得られる。

【0031】

なお、上記スキームにおいて、ハロゲン化脂肪酸アルキルエステルは、 $X-(CH_2)_nCOOR^1$ で示され (X はハロゲン、 R^1 はアルキル基、n は 1 ~ 10 の整数である)、上記アミノ酸、ペプチドなどのアミノ基を含有する化合物は、ZH で示されている。

【0032】

(免疫測定法)

本発明のダイオキシン類の免疫測定法においては、2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルアミド誘導体 (II) を競合抗原として用いる。測定の手法は、通常の免疫測定法と同様である。免疫測定法には酵素免疫測定法 (EIA)、放射性免疫測定法 (RIA)、蛍光免疫測定 (FIA) などが挙げられるが、特に限定されない。これらの免疫測定法においては、競合型測定法、非競合型測定法、均質法などの手法により測定が行われる。ダイオキシン類は低分子化合物であるため、一般には競合法により行なう。競合法には主にマイクロプレートのウェルやチューブに抗原を固定化する間接競合法と、ウェルやチューブに抗体を固定化する直接競合法とがある。

【0033】

上記免疫測定法のうち、測定の簡便さから EIA を用いることが望ましい。以下に、EIA を利用して、間接競合法および直接競合法によりダイオキシン類を測定する場合を各々例に挙げて、本発明を説明する。

【0034】

間接競合法による測定の例を次に示す。まず、上記 2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルアミド誘導体 (II) (化合物 (II)) を抗原として、Z 部分を

介して、マイクロタイタープレートのウェルなどの固相に固定する。次いで化合物 (II) が結合していない固相表面を、牛血清アルブミン、カゼインなどの市販のブロッキング剤でブロックする。

【 0 0 3 5 】

次に、抗ダイオキシン類抗体を準備する。この抗体は、公知の方法に従ってダイオキシンをハプテン化し、牛血清アルブミンなどのキャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートを免疫用抗原として哺乳動物に免疫することにより作製することができる (非特許文献 2) 。この抗ダイオキシン類抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよいが、均一性を考慮すると、モノクローナル抗体であることが望ましい。

【 0 0 3 6 】

次に、該化合物 (II) が固定化された固相に、一次抗体である抗ダイオキシン類抗体および検体を接触させて、該検体中のダイオキシン類と固相化抗原 (化合物 (II)) を一次抗体に対して競合反応させる。次いで、固相を洗浄して、検体および結合しなかった一次抗体などを除去した後、標識された抗免疫グロブリン抗体 (標識化二次抗体) を加えて、固相に結合した一次抗体に結合させる。次いで固相を洗浄し、固相に結合した酵素標識を検出する。予め、化合物 (II) の濃度を種々変えて、一次抗体、および標識化二次抗体を用いて作成した検量線に基づいて、この測定値から、検体中のダイオキシン濃度が算出される。

【 0 0 3 7 】

他方、直接競合法による測定は次のように行われる。まず、抗ダイオキシン類抗体をウェルなどの固相に固相化し、ブロッキングを行う。これに、標識された化合物 (II) と検体とを付与し、該固相化抗体と、検体および標識された化合物 (II) とを競合反応させる。固相を洗浄後、上記間接競合法の場合と同様に標識を検出する。予め、標識された化合物 (II) と標識されていない化合物 (II) の割合を種々変え、固相化された抗ダイオキシン類抗体に対して競合させて作成した検量線に基づいて、この測定値から、検体中のダイオキシン濃度が算出される。

【 0 0 3 8 】

間接競合法では、一次抗体を標識し、直接競合法では抗原（化合物(II)）を標識する。標識としては、例えば、HRP、ALPなどの酵素、ローダミンなどの蛍光物質、または化学発光物質が挙げられる。化合物（II）の標識化は、当業者が通常用いる方法、例えば、化合物（II）と標識物質とを緩衝液中で接触させることにより、行われる。EIA、RIA、およびFIAの各方法においては、これらの標識に応じて、通常の手法により検出が行われる。

【0039】

2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルアミド誘導体（II）は、毒性係数を持たず、かつ抗ダイオキシン抗体と反応する特性を有するため、これを競合免疫測定 of 競合抗原として用いることにより、毒性の高いダイオキシン自体を使用する必要がなくなり、測定者の作業時の安全性が確保される。

【0040】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

【0041】

実施例1 6-（2, 4, 5-トリクロロフェノキシ）ヘキサン酸（Ia）の調製

2, 4, 5-トリクロロフェノール（III）987mg（5mmol）および無水炭酸カリウム1.04g（7.5mmol）を無水ジメチルホルムアミド8mlに加えて攪拌し、これに6-ブロモヘキサン酸エチルエステル1.67g（7.5mmol）を加え、60℃で16時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧下濃縮し、残渣をジクロロメタンで抽出し、水で洗浄後、減圧下濃縮乾固させた。残渣をジオキサン10mlとメタノール12.5mlの混液に溶解し、攪拌下、10N水酸化ナトリウム2.5mlを加え、室温で6時間攪拌した。反応終了後、水を5ml加えてから、6N塩酸で中和した。溶媒を減圧下留去し、残渣に1N塩酸を加え、クロロホルムで抽出し、水で洗浄後、減圧下濃縮乾固させ、ヘキサン-エーテルの混液を用いて粉末化し、6-（2, 4, 5-トリクロロフェノキシ）ヘキサン酸（Ia）（以下、化合物（Ia）ということがある）を1.3

2 g (収率 85%) 得た。

【0042】

得られた 6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸 (Ia) の物性データ (NMR) を、図 1 に示す。

【0043】

実施例 2 6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸アミド誘導体 (IIa) の調製

実施例 1 で得られた化合物 (Ia) を用い、以下に示す活性エステル法により競合測定用抗原として用いられる 6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸アミド誘導体を作製した。化合物 (Ia) 312 mg (1 mmol)、N-ヒドロキシスクシンイミド 138 mg (1.2 mmol)、およびトリエチルアミン 152 mg (1.5 mmol) を無水ジメチルホルムアミド 4 ml に溶解し、1-エチル-3-(3'-ジエチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 288 mg (1.5 mmol) を加えた後、室温下で 16 時間攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧下留去し、残渣をクロロホルムで抽出し、水で洗浄後、有機層を減圧下、濃縮乾固させた。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン：酢酸エチル = 4 : 1 で溶出) にて精製し、スクシンイミジル 6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサノエート (Va) (以下、化合物 (Va) ということがある) を 360 mg (収率 88%) 得た。

【0044】

スクシンイミジル 6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサノエート (Va) の物性データ (NMR) を、図 2 に示す。

【0045】

得られた化合物 (Va) とキャリアー蛋白質である牛血清アルブミン (BSA) とを以下に示す手段で結合させて、6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸アミド誘導体 (IIa) を調製した。

【0046】

まず、50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解した牛血清アルブミンの溶液 1 ml (BSA 15 mg 相当分: 2.27×10^{-7} mol) を氷冷攪拌下、

ジメチルスルホキシド (DMSO) 545.5 μ l 加え、その後、化合物 (Va) の 20 mM ジメチルスルホキシド溶液 454.5 μ l (40 当量: 9.09×10^{-6} mol) を滴下し、室温で 1 時間反応させた。反応液を予め 10 mM リン酸緩衝化生理食塩水 (pH 7.2) (PBS) で平衡化したゲルろ過カラム PD-10 (アマシャムバイオサイエンス社製) にロードして PBS で溶出させ、3.5 ml から 5.0 ml の間の溶出画分 1.5 ml を集めた。この画分を PBS で 2.0 ml に希釈し、約 5 mg/ml 濃度の化合物 (Va) と BSA との結合物 (化合物 (IIa)) を得た。得られた化合物 (IIa) は、競合免疫測定用の抗原として用いられる。

【0047】

実施例 3 モノクローナル抗体を用いる、本発明の化合物のダイオキシシキニ類異性体に対する特異性評価

種々のモノクローナル抗体について、ダイオキシシキニ類異性体に対する特異性を検討した。モノクローナル抗体は、プリスタン前投与マウスの腹腔に抗体産生細胞株を移植し、細胞の増殖と共に腹腔内に溜まった腹水を回収し、Protein G-Sepharose (BIO-RAD 社製) を担体としたアフィニティークロマトグラフィーにより調製した。3 種類の抗体産生細胞 (クローン) C-1、C-2、および C-3 を用い、それぞれ、モノクローナル抗体を調製した。なお、クローン C-1、C-2 および C-3 は、それぞれ、2, 3, 7, 8 位に塩素が置換されたジベンゾダイオキシシキニに対するモノクローナル抗体を産生する。

【0048】

特異性評価は、以下の原理により行った。遊離しているモノクローナル抗体 (抗ダイオキシシキニ抗体) に対し、固相化抗原 (コンペティター) と遊離のダイオキシシキニ類 (リガンド) とを競合させた場合、モノクローナル抗体とダイオキシシキニ類との反応性が、モノクローナル抗体と固相化抗原との反応性よりも高ければ (すなわち、抗体とダイオキシシキニ類との特異性が高ければ)、固相化抗原へのダイオキシシキニ類の結合が低下し、発色の程度が減少することを利用する。

【0049】

まず、免疫用抗原あるいは実施例 2 で作製した BSA と結合した化合物 (IIa

) を P B S で $1\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように希釈し、それぞれ、 $50\mu\text{l}$ ずつ、96 穴アッセイプレート (Costar 社製、Cat.No. 3590) の各ウェルに分注し、プレートをシールして室温で 1 時間静置した。Tween20 を 0.005% 含む P B S で 3 回洗浄した後、蒸留水で 25% 濃度に希釈調製したブロックエース (雪印乳業製) $300\mu\text{l}$ を各ウェルに分注し、プレートをシールして、 37°C で 2 時間静置した。各ウェルを、T w e e n 2 0 を 0.005% 含む P B S で 3 回洗浄した後、T r i t o n X100 を 0.01% 含む 20% DMSO (希釈溶媒) で最終濃度 $5\times 10^{-7}\text{M}$ に希釈したダイオキシン類化合物を $25\mu\text{l}$ ずつ各ウェルに添加した。対照として、希釈溶媒を $25\mu\text{l}$ ずつ各ウェルに添加した。その後、直ちに、 $1\text{mg}/\text{ml}$ BSA を含む P B S で希釈した抗体溶液を各ウェルに $25\mu\text{l}$ ずつ添加し、プレートを軽く振とう攪拌し、室温で 1 時間静置した。

【0050】

Tween20 を 0.005% 含む P B S で 3 回洗浄した後、10% ブロックエースで 2000 倍に希釈したヤギ抗マウス I g G (H+L) H R P 標識抗体 (アフィニティー精製) $50\mu\text{l}$ を分注した。プレートを室温で 1 時間静置した後、Tween20 を 0.005% 含む P B S で 3 回洗浄し、各ウェルに H R P 基質である TMB (K P L 社製) $50\mu\text{l}$ を分注し、5~10 分間室温で静置した。各ウェルに $5\mu\text{l}$ ずつ 1M リン酸溶液を添加し、マイクロタイター用分光光度計で波長 455nm (対照 655nm) の吸光度を測定した。反応性評価は、対照 (希釈溶媒) である 各ダイオキシン類化合物非添加時の吸光度 (B_0) と、各ダイオキシン類化合物添加時の吸光度 (B) を求めて、以下の式により阻害率を測定した。

$$\text{阻害率} = \{ (B_0 - B) / B_0 \} \times 100 (\%)$$

この阻害率が大きいくほど、抗ダイオキシン抗体とダイオキシン化合物との特異性が高いと評価した。結果を表 1 に示す。

【0051】

【表 1】

クローンNo.	C-1	C-1	C-2	C-2	C-3	C-3
固相化抗原	免疫原	*	免疫原	*	免疫原	*
2,3,7,8-TeCDD	0.4	7.4	-3.0	7.7	-0.2	-3.4
1,2,3,7,8-PeCDD	21.3	46.2	45.7	70.4	5.4	31.2
1,2,3,4,7,8-HxCDD	-1.4	14.1	-9.4	19.1	-2.5	-2.3
1,2,3,6,7,8-HxCDD	3.1	-0.3	-6.2	2.2	3.9	6.7
1,2,3,7,8,9-HxCDD	15.7	19.1	30.6	41.9	6.7	28.6
1,2,3,4,6,7,8-H _p CDD	1.5	1.4	-12.4	-3.2	0.4	2.1
OCDD	-2.5	1.6	0.1	9.4	-0.4	-3.7
2,3,7,8-TeCDF	1.6	8.4	15.3	37.6	-1.6	4.3
1,2,3,7,8-PeCDF	11.8	27.1	17.5	68.6	0.5	23.2
2,3,4,7,8-PeCDF	26.5	40.1	40.2	55.0	13.0	46.2
1,2,3,4,7,8-HxCDF	3.3	-1.5	5.2	-11.2	4.9	0.8
1,2,3,6,7,8-HxCDF	3.5	7.0	9.4	5.0	2.9	4.1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	26.2	34.7	43.3	68.1	10.4	48.1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	31.1	44.8	28.1	82.8	13.2	47.9
1,2,3,4,6,7,8-H _p CDF	-0.9	7.5	6.8	51.4	-2.7	3.4
1,2,3,4,7,8,9-H _p CDF	5.8	7.1	27.7	7.5	6.1	11.3
OCDF	1.1	27.0	18.1	7.2	1.3	4.9

*: 6-(2,4,5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸アミド誘導体のハプテン化物

【0052】

なお、表1における免疫原1～3は、それぞれ、免疫用抗原である2, 3, 7, 8位に塩素が置換されたジベンゾダイオキシンのハプテン化物を示し、*は6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸アミド誘導体(IIa)のハプテン化合物を示す。

【0053】

表1の結果から、本発明の化合物である2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルカルボン酸、およびその誘導体である2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルアミド誘導体を固相化抗原として用いることにより、免疫用抗原を固相化抗原として用いる場合に比べ、はるかに高感度の測定系を提供できることが示された。

【0054】

実施例4 塩素含有有機化合物に対する特異性評価

抗体として1, 2, 3, 7, 8-PeCDFに対する抗ダイオキシン抗体（モノクローナル抗体）を用い、この抗ダイオキシン抗体に対して固相化抗原6-（2, 4, 5-トリクロロフェノキシ）ヘキサン酸アミド誘導体（IIa）のハプテン化物および表2並びに表3に記載の塩素含有有機化合物とを競合させて、実施例3と同様に競合反応を行わせ、交差反応性を検討した。用いたダイオキシン類は、それぞれ、表2に記載の毒性等価係数（TEF値）を有している。結果を表2および表3に示す。

【0055】

【表2】

TEFを有する ダイオキシン類	TEF値	交差反応 (%)
2,3,7,8-TeCDD	1	1.1
1,2,3,7,8-PeCDD	1	29.9
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	24.8
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	18.0
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	39.8
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	17.0
1,2,3,4,6,7,8,9-OCDD	0.0001	<0.1
2,3,7,8-TeCDF	0.1	1.5
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	100.0
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	16.1
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	45.9
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	36.6
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	42.7
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	43.8
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	17.9
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	28.7
1,2,3,4,6,7,8,9-OCDF	0.0001	8.0

【0056】

【表 3】

多環芳香族炭化水素類	交差反応 (%)
Anthracene	<0.1
Naphthalene	<0.1
Fluoranthene	<0.1
Pyrene	<0.1
Fluorene	<0.1
Benz[a]anthracene	<0.1
Benzo[b]fluoranthene	<0.1
Benzo[k]fluoranthene	<0.1
Benzo[ghi]perylene	<0.1
Chrysene	<0.1
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	<0.1
Phenanthrene	<0.1
1,2,3,7,8-PeCDF	100.0
コプラナ-PCB類	交差反応 (%)
3,3',4,4'-TeCB	<0.1
3,3',4,4',5-PeCB	<0.1
3,3',4,4',5,5'-HxCB	<0.1
クロロベンゼン-クロロフェノール類	交差反応 (%)
m-Dichlorobenzene	<0.1
1,2,3-Trichlorobenzene	<0.1
2,4-Dichlorophenol	<0.1
3,4-Dichlorophenol	<0.1
2,4,5-Trichlorophenol	<0.1
その他	交差反応 (%)
p-chlorobiphenyl	<0.1

【0057】

これらの結果から、本発明の化合物は、ダイオキシン類に特異的に、かつ広い範囲のダイオキシン異性体と反応し得ることがわかる。

【0058】

【発明の効果】

本発明によれば、新規な 2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルカルボン酸（化合物（I））および 2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルアミド誘導体（化合物（II））が提供される。化合物（I）および化合物（II）は、免疫測定法による抗原として用いられる。特に、化合物（II）は、間接免疫測定法の固相化抗原として用いられ、広範囲なダイオキシン類異性体を特異的に検出および測定することができる。本発明の免疫測定法を用いることにより、大気、排ガス、土壌、河川、燃焼灰などの環境試料中のダイオキシン類の分析に広く応用することができ、さらに、食品、母乳、血液、尿などの生体試料の分析においても有用である。この測定法を採用することにより、毒性の高いダイオキシン類自体を使用する必要がなくなるため、測定作業時の安全性が大幅に向上する。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

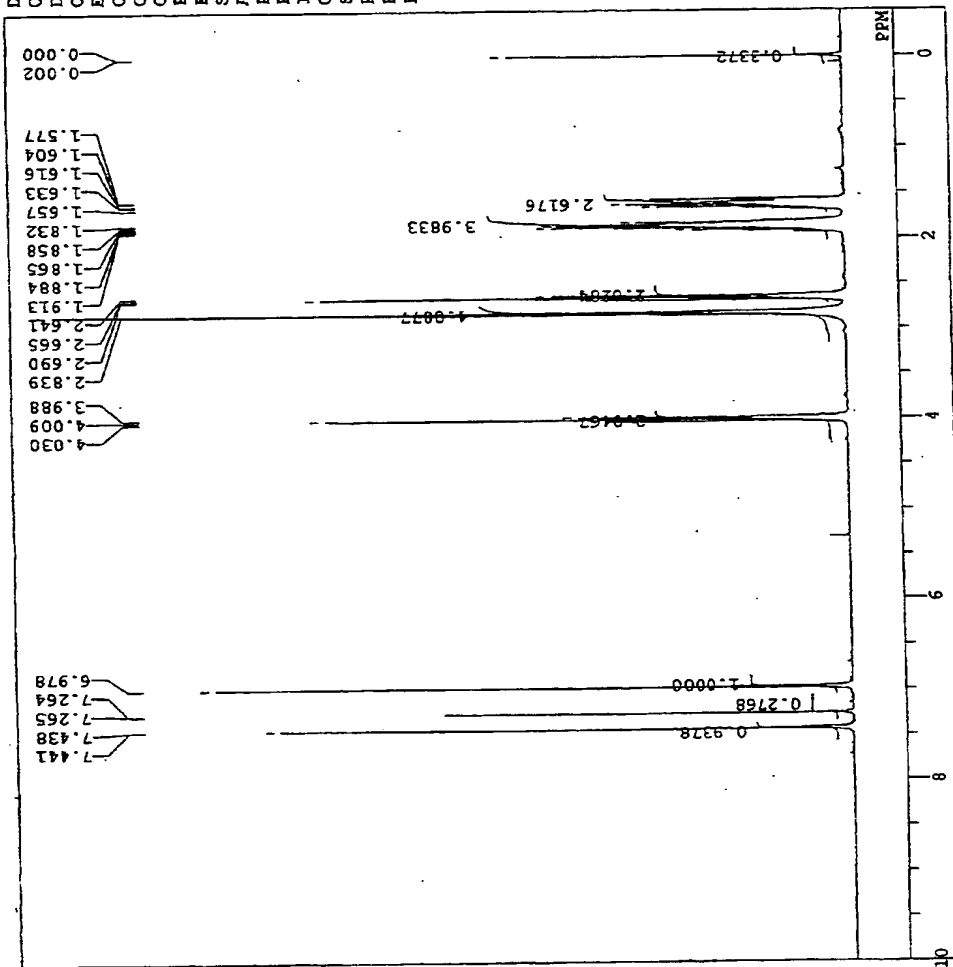
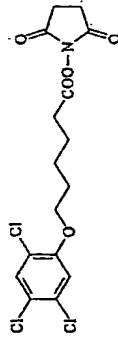
6-（2, 4, 5-トリクロロフェノキシ）ヘキサン酸（Ia）の物性データ（NMR）を示す図である。

【図 2】

スクシンイミジル 6-（2, 4, 5-トリクロロフェノキシ）ヘキサノエート（Va）の物性データ（NMR）を示す図である。

【図 2】

D:\WINMR98\DATA\1G\yosh
COMPT Step 3 (scale up)
DATIM Fri Oct 19 10:19:05 2001
OBNUC 1H
EXMOD NON
OBFRQ 300.40 MHz
OBSET 131.70 KHz
OBFIN 48.8 Hz
POINT 32768
FREQU 4810.0 Hz
SCANS 16
ACQTH 6.812 sec
PD 1.551 sec
PWL 6.1 us
IRNUC 1H
CTEMP 23.5 C
SLVNT CDCL3
EXREF 0.00 ppm
BF 0.12 Hz
RGAIN 16



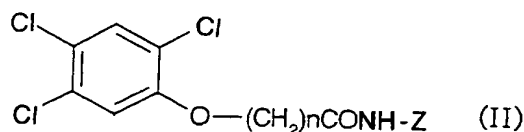
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ダイオキシン類の代替物として免疫測定の際の固相化抗原として利用可能な化合物、および該化合物を用いた免疫測定法を提供すること。

【解決手段】 以下の式 (II) :

【化 1】



(ここで、n は 1 から 10 の整数を示し、Z は担体化合物または標識物質を表す) で表される 2, 4, 5-トリクロロフェノキシアルキルアミド誘導体を競合免疫測定用の抗原として用いるダイオキシン類の免疫測定法を提供する。この化合物は、毒性を持たず、ダイオキシン類に特異的であり、広い範囲のダイオキシン類の異性体と結合し得るので、安全かつ簡易なダイオキシンの測定法が提供される。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 0 8 7 0 3 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 3 3 0 3 2]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜 1 丁目 3 番 2 3 号

氏 名

株式会社タクマ